



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
INSTITUTO DO MAR
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO MAR



Heloísa Helena Perez Mota

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS DE DICLOFENACO EM
INVERTEBRADOS MARINHOS BENTONICOS ASSOCIADA À
ACIDIFICAÇÃO OCEÂNICA**

SANTOS
2020

Heloísa Helena Perez Mota

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS DE DICLOFENACO EM
INVERTEBRADOS MARINHOS BENTONICOS ASSOCIADA À
ACIDIFICAÇÃO OCEÂNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Ciências
do Mar da Universidade Federal de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências do Mar.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Cesar

SANTOS

2020

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M917a Mota, Heloisa Helena.
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS DE DICLOFENACO
EM INVERTEBRADOS MARINHOS BENTONICOS ASSOCIADA À
ACIDIFICAÇÃO OCEÂNICA. / Heloisa Helena Mota;
Orientador Augusto Cesar; Coorientador Fábio
Pusceddu. -- Santos, 2020.
32 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Bacharelado Interdisciplinar em
Ciências e Tecnologia do Mar) -- Instituto do Mar,
Universidade Federal de São Paulo, 2020.

1. Baixada Santista. 2. Toxicidade. 3.
Biomarcador. 4. Fármacos. 5. Mexilhões. I. Cesar,
Augusto, Orient. II. Título.

CDD 551.46

RESUMO

Com a crescente quantidade de CO₂ sendo emitida de fontes antrópicas, a absorção de carbono pelos oceanos acarreta a formação de ácido carbônico, que quando dissociado, aumenta a presença de íons [H]⁺, tornando o pH da água mais ácido. Essa mudança de pH altera as características geofísicas do mar, como mudança de solubilidade e mobilidade de poluentes. A presença de fármacos no ambiente marinho vem sendo mais preocupante do que a presença de outros compostos químicos bioativos, visto que são formulados visando alterar a fisiologia e/ou comportamento de organismos alvo. Além disso, sua taxa de remoção dificilmente passa dos 50% e o cenário só se agrava com a falta de saneamento e tratamento de esgoto. Todavia, ainda há poucos dados sobre a biodisponibilidade e efeitos associados ao comportamento desses compostos, especialmente em um cenário de acidificação oceânica. O diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroide amplamente utilizado em todo o mundo, cujo consumo excede 100 toneladas por ano. Sua presença foi identificada não somente no local de estudo, mas também em outros lugares como Mar mediterrâneo, Mar Adriático e Mar Norte. Nos ensaio de toxicidade realizado em três diferentes pHs (8,0; 7,6 e 7,3), nos dois primeiros tratamentos, houve uma diminuição significativa do tempo de retenção do corante vermelho neutro em concentrações ambientalmente relevantes nos pH 8,0 e 7,6 e após a análise estatística, somente no pH 7,3 não apresentou diferença significativa entre as concentrações.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização dos pontos de coleta no entorno do Emissário Submarino de Santos (ESS) e suas respectivos posicionamentos na América do Sul.	14
Figura 2 - Estrutura química do diclofenaco.	16
Figura 3 - Esquema do sistema de injeção de CO ₂ automático para a realização do experimento.	17
Figura 4 - Médias e erro-padrão dos resultados de citotoxicidade em hemócitos do molusco bivalve <i>P. perna</i> em água após 96 horas de exposição ao DIC nos diferentes pH.	20
Figura 5 - Médias e desvio-padrão dos resultados da comparação entre os controles dos ensaios de citotoxicidade em hemócitos do molusco bivalve <i>P. perna</i> após 96 horas de exposição.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.	14
Tabela 2 - Resultados do sistema de carbonatos em ensaios na matriz água com <i>P. perna</i> expostos ao DIC sob pH 8,0.	21
Tabela 3 - Resultados do sistema de carbonatos em ensaios na matriz água com <i>P. perna</i> expostos ao DIC sob pH 7,6.	21
Tabela 4 - Resultados do sistema de carbonatos em ensaios na matriz água com <i>P. perna</i> expostos ao DIC sob pH 7,3.	22
Tabela 5 - Ocorrências recentes de DIC em ambientes aquáticos	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Acidificação Oceânica	8
1.1.3 Fármacos	10
1.2. Objetivo	12
1.2.1 Objetivo Específico	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 Área de estudo	13
2.2 Coleta de amostras.....	14
2.3 Coleta dos organismos	15
2.4 Diclofenaco	15
2.5 Sistema de CO ₂	16
2.6 Ensaio de toxicidade.....	17
2.7 Análise de Resultados	19
3 RESULTADOS	20
4 DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidificação Oceânica

Nos últimos 200 anos, atividades antrópicas levaram a um aumento de 280 para mais de 365 de CO₂ atmosférico (*Keeling & Whorf, 2000*). Essa alta emissão de CO₂ na atmosfera por parte da humanidade é resultado principal da queima de combustíveis fósseis, mas também de práticas de uso de solo, como o desflorestamento (*Houghton et al., 2004*).

Contudo, medidas e reconstruções do CO₂ atmosférico histórico revelaram que menos da metade dessas emissões permanecem na atmosfera (*Prentice et al., 2001*). Do restante, cerca de 30% desse gás foi absorvido pelo oceano e 20%, pela biosfera terrestre (*Sabine et al., 2004*).

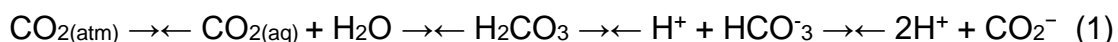
As alterações nos padrões climáticos globais foram alvos de diversos estudos nas últimas décadas com o intuito de compreender como o meio ambiente e a biodiversidade seriam impactados com estas mudanças a longo prazo (*Vinagre et al., 2016; Passarelli et al., 2017*). Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas, para equilibrar as concentrações atmosféricas em níveis que impeçam a interferência no sistema climático, a emissão de gases de efeito estufa teria que ser reduzida em cerca de 5080% (IPCC, 2007).

Visando mitigar o aumento de CO₂ na atmosfera, a Tecnologia de Captura e Armazenamento de CO₂ (CCS) é vista por diversos órgãos e convênios internacionais (IPCC, Painel de Especialistas da UNESCO para mudanças climáticas, convênios OSPAR e Londres, entre outros) como um meio eficaz de diminuir a concentração de CO₂ da atmosfera. O relatório especial sobre a captura e armazenamento de CO₂ do IPCC (2007) defende que essa atividade poderia contribuir com a diminuição em cerca de 20-55% das emissões deste gás até o ano de 2100. Apesar desta tecnologia ser considerada relativamente segura, o seu sucesso depende da retenção estável do CO₂ dentro de formações geológicas, que são utilizadas como locais de armazenamento.

Todavia, é necessário considerar que existe a possibilidade de fugas acidentais deste gás armazenado sob a água adjacente e ao sedimento marinho, representando uma grave ameaça para o ambiente nas adjacências do local do

acidente (Friedmann, 2007). Embora dados sobre possíveis riscos desta atividade sejam imprescindíveis em estudos de impacto ambiental, essas informações ainda são desconhecidas (Keating et al., 2011).

Todo CO₂ produzido e emitido não se mantém na atmosfera. Cerca de um quarto desse CO₂, aproximadamente 26 milhões de toneladas, é absorvido todos os dias pelos oceanos (Gattuso *et al.*, 2017). Uma vez dissolvido na água do mar, o CO₂ reage com a água tendo como consequência a formação do ácido carbônico (H₂CO₃). Este, por sua vez, pode se dissociar, o que implica na perda de íons de hidrogênio, resultando nos íons carbonato (CO₃²⁻) e bicarbonato (HCO₃⁻). Vale ressaltar que as reações da água do mar são reversíveis e tendem ao equilíbrio (Millero *et al.*, 2002). Essa cadeia de reações está escrita na equação (1).



Conforme a concentração de CO₂ atmosférico aumenta na água, elevamos as concentrações aquosas de CO₂, de íons bicarbonato e de íons hidrogênio. Em decorrência do aumento de concentração de íons H⁺, ocorre a redução da concentração de íons carbonato, juntamente com a acidificação do meio, conforme demonstrado na equação (2)

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+] \quad (2)$$

A capacidade do oceano de absorver o gás carbônico atmosférico depende da extensão da dissolução de CaCO₃ na coluna d'água ou em sedimentos, como é mostrado na equação (3).



O mineral CaCO₃ deriva de conchas e esqueletos de organismos marinhos, incluindo plânctons, corais, algas coralinas e muitos outros invertebrados (Doney *et al.*, 2009). As taxas de formação e dissolução de CaCO₃ variam com o estado de saturação, que é definido como o produto iônico das concentrações de íons de cálcio e carbonato, que pode ser calculado de acordo com a equação (4) abaixo:

$$\Omega = [\text{Ca}^{2+}] [\text{CO}_3^{2-}] / K'_{\text{sp}} \quad (4)$$

A solubilidade aparente (K'_{sp}) depende da temperatura, da salinidade, da pressão e da fase do mineral. De modo geral, a formação de casca e de esqueleto

acontece quando o resultado do cálculo do estado de saturação é maior que 1,0 e a dissolução dessas estruturas quando esse é menor do que 1,0, com exceção de conchas ou esqueletos protegidos por revestimentos orgânicos, por exemplo.

De maneira geral, quando ocorre a diminuição do pH oceânico, os carbonatos disponíveis no ambiente marinho se ligam aos íons H^+ , o que os torna menos disponíveis para formar o carbonato de cálcio, sendo este um mineral essencial para o desenvolvimento de organismos calcificadores (Sodré *et al.*, 2016).

Estudos projetam que as emissões contínuas de CO_2 causarão redução do pH do oceano entre 0,3 e 0,6 unidades até o final do século (Caldeira & Wickett, 2005; IPCC, 2014; Joos *et al.*, 2011).

Variações na temperatura, pH e nos níveis de oxigênio dissolvido, bem como a disponibilidade de nutrientes, são exemplos de parâmetros que podem sofrer alterações e desta forma, deixar os ecossistemas marinhos instáveis e vulneráveis (Passarelli *et al.*, 2017).

A nível biológico, a redução na sobrevivência, no crescimento, desenvolvimento, calcificação e abundância são respostas de uma ampla gama de organismos marinhos em cenários de acidificação, o que sugere que os efeitos desse fenômeno afetam a vida marinha como um todo (Kroeker *et al.*, 2013).

Além dos efeitos diretos em organismos marinhos, a acidificação também altera a geoquímica do meio, resultando em mudanças na solubilidade e mobilidade de poluentes previamente incorporados ao sedimento marinho (Ardelan *et al.*, 2009; Payán *et al.*, 2012; Basallote *et al.*, 2012; De Orte *et al.*, 2014b, Passarelli *et al.*, 2018a; 2018b; 2018c).

1.1.3 Fármacos

Com o crescente aumento da população humana, o uso de medicamentos vem sendo cada vez maior, e conseqüentemente há um aumento na quantidade e diversidade de fármacos consumidos e excretados. Apesar dos estudos de fármacos no meio ambiente serem relativamente novos, muitos deles vêm sendo publicados

desde os anos 90 até os dias de hoje, permitindo a descrição e relato de diferentes concentrações ambientais em diversas matrizes e lugares do mundo (Botelho, 2015).

Essas substâncias adentram o ambiente por meio do lançamento de esgotos domésticos, sendo eles tratados ou *in natura*. Os fármacos diferem de outros compostos químicos bioativos (como por exemplo os pesticidas) porque são geralmente formulados para alterar a fisiologia ou até mesmo comportamento do alvo (Arnold *et al.*, 2014).

Em um aspecto ambiental, são considerados pseudopersistentes, visto que sua emissão no ambiente é constante e só são removidos de 10 a 50% do total que é lançado (Hernando *et al.*, 2006). No Brasil, 49.8% das cidades apresentam coleta de esgoto e somente 70% do esgoto coletado passa por algum tipo de tratamento (Brasil, 2016). Para agravar o quadro, os tratamentos convencionais não são eficientes para a completa remoção de fármacos residuais (Santos *et al.*, 2010).

Em relação aos fármacos de uso humano, alguns podem chegar aos sistemas aquáticos de forma inalterada ou como metabólito, cujo tratamento de esgoto remove parcialmente os contaminantes (Aquino *et al.*, 2013; Gartiser *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2009). Há também fármacos que são introduzidos no meio ambiente deliberadamente, como é o caso de descarte de efluentes hospitalares e fármacos fora do prazo de validade, inclusive os de uso veterinário (Delgado *et al.*, 2012; Farré *et al.*, 2008; Ternes *et al.*, 2002).

Apesar dos estudos de fármacos no meio ambiente serem relativamente novos, muitos deles vêm sendo publicados desde os anos 90 até os dias de hoje, permitindo a descrição e relato de diferentes concentrações ambientais em diversas matrizes e lugares do mundo (Botelho, 2015)

Em estudo sobre a ocorrência de fármacos e cocaína na zona costeira brasileira, o DIC foi detectado em todas as amostras coletadas na Baía de Santos em uma concentração de 19,4ng/L (Pereira *et al.*, 2016). Além disso, o composto está entre os anti-inflamatórios não esteroides (AINE's) mais detectados nas águas do Mar do Norte, Mar Mediterrâneo e mar Adriático e nos oceanos Pacífico e Índico em concentrações acima de 100 ng·L⁻¹ (Lolic *et al.*, 2015).

O diclofenaco (DIC) é um fármaco anti-inflamatório não esteroide (AINE) e de acordo com o estudo desenvolvido por McGettigan *et al.* (2013), é o AINE mais utilizado nos 15 países que foram analisados. Além disso, os efeitos adversos dessa classe de medicamentos são bem conhecidos (Grosser *et al.*, 2006); entre desses efeitos, os mais perigosos são as complicações gastrointestinais (Henry *et al.* 1996) (Masso *et al.* 2010) e cardiovasculares (Hernandez *et al.* 2006); Singh *et al.* 2006; McGettigan *et al.* 2006; Trelle *et al.* 2011; McGettigan *et al.* 2011). Além de seu uso recorrente pela população, o DIC também é utilizado na área de medicina veterinária (Fent *et al.*, 2006), resultando em um consumo anual superior a 100 toneladas (Zhang *et al.*, 2008).

Tendo em vista sua presença do fármaco estudado em diversos locais do mundo e as previsões de diminuição de pH ao longo dos anos, há uma necessidade de saber os efeitos que a presença desse fármaco acarretará no ambiente marinho em diferentes cenários de acidificação oceânica.

Dessa maneira, o presente estudo teve como hipótese inicial que o aumento de pH proveniente da acidificação oceânica junto ao diclofenaco afetará negativamente os organismos marinhos, o que implicará em danos ao ecossistema.

1.1 Objetivo

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar os possíveis impactos ambientais causados pela biodisponibilidade e toxicidade do fármaco diclofenaco (DIC) empregando o mexilhão da espécie *Perna perna* frente a diferentes cenários de acidificação oceânica.

1.2.1 Objetivo Específico

- Investigar os efeitos subletais e citotóxicos do fármaco em questão empregando bivalves *Perna perna* nos diferentes cenários de acidificação através da infusão de CO₂;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

A região da Baixada Santista, localizada no Estado de São Paulo (23°30'S-24°S e 46°5'W-46°30'W), região Sudeste do Brasil, tem uma grande importância econômica já que nela está localizado o Porto de Santos, o maior porto da América Latina, e o polo industrial da cidade de Cubatão. Devido a esses fatores, o local se tornou exemplo de degradação ambiental graças a poluições decorrentes dos processos industriais e portuários. Baseadas em dados e registros de efluentes líquidos da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), as fontes potenciais de poluição foram identificadas e caracterizadas, sendo elas: terminais portuários, lixões, aterros sanitários, resíduos tóxicos tratados inadequadamente, lançamento *in natura* de esgoto em canais, rios e mar (CETESB, 2001).

Com uma grande carga de resíduos tóxicos e efluentes líquidos contaminados nas regiões estuarinas de Santos e São Vicente, os resíduos industriais, em conjunto com os resíduos domésticos do Porto de Santos e das cidades da região, provocaram um quadro crítico de degradação ambiental, com sérios reflexos sociais e de saúde pública. Este cenário é agravado uma vez que as cidades de Santos e Guarujá não possuem estações de tratamento de esgoto, e sim estações de pré-condicionamento, cujo efluente é lançado ao mar via emissário submarino. O único tratamento nesse caso é a retenção de partículas sólidas por meio de grades e esporadicamente a desinfecção com adição de cloro (CETESB, 2017).

Frente a esses cenários de degradação ambiental, a CETESB, entre outros pesquisadores, realizou diversos estudos para avaliação da qualidade ambiental e para se minimizar os impactos na região. Todavia, a questão da contaminação ambiental por fármacos ainda é pouco estudada na região (Pereira *et al.*, 2016; Pusceddu *et al.*, 2018).

As altas concentrações de fármacos na região concomitante ao amplo gradiente de contaminação, tornam o local ideal para o estudo da interação entre os processos de acidificação e a biodisponibilidade e toxicidade desses compostos em organismos marinhos.

2.2 Coleta de amostras

As amostras utilizadas nesse estudo foram de águas superficiais coletadas em 5 pontos ao redor do ponto de emissão do esgoto do Emissário Submarino de Santos e com elas foram determinadas as concentrações ambientais do DIC. Os pontos foram selecionados de acordo com os critérios da CETESB levando em consideração a pluma de dispersão do efluente, como mostra a Figura 1. A coleta das amostras foi feita com auxílio de garrafas de *van Dorn*, que depois foram mantidas em frascos âmbar em caixas térmicas com gelo durante o transporte até o laboratório. Após a chegada ao laboratório, foram armazenadas em uma temperatura de -18°C até que as análises fossem feitas.

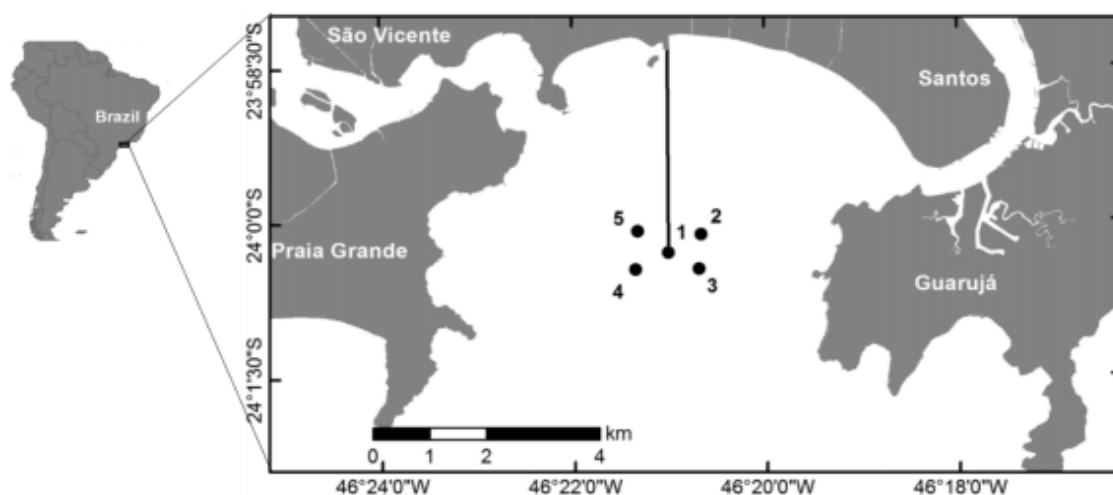


Figura 1 - Localização dos pontos de coleta no entorno do Emissário Submarino de Santos (ESS) e suas respectivos posicionamentos na América do Sul.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

Locais de amostragem	Latitude	Longitude
Ponto 1	24°00'041" S	46°21'048" W
Ponto 2	23°59'997" S	46°21'664" W
Ponto 3	23°59'858" S	46°20'776" W
Ponto 4	24°00'284" S	46°21'155" W
Ponto 5	23°59'764" S	46°19'227" W

2.3 Coleta dos organismos

Os indivíduos adultos de *P. perna* foram adquiridos em uma fazenda de cultivo localizada na praia da Cocanha (Caraguatatuba, SP). Os organismos foram transportados em caixa térmica até o laboratório, onde foram mantidos em tanques com água do mar e aeração até o momento da realização do ensaio de toxicidade. O uso dos organismos foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa da Unifesp em 2020, Processo nº 3176061020.

2.4 Diclofenaco

O DIC (CASRN: 15307-86-5) é um derivado do ácido benzeno acético não esteroidal com atividade anti-inflamatória, além de ter função como analgésico não narcótico, antipirético, inibidor de EC 1.14.99.1 (prostaglandina-endoperóxido sintase), xenobiótico, contaminante ambiental e medicamento alérgeno. Como AINE, o DIC se liga e quela as duas isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e 2), bloqueando assim a conversão do ácido araquidônico em pró-inflamatórias-proprostaglandinas. Este agente também pode inibir a angiogênese tumoral mediada por COX-2. Ao inibir a COX-2, o DIC pode ser eficaz no alívio da dor e inflamação; ao inibir a COX-1, pode produzir efeitos colaterais gastrointestinais inaceitáveis. Este agente pode ser mais ativo contra COX-2 do que vários outros AINEs que contem ácido carboxílico

Sua formula molecular é $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$, com peso molecular de 296,1 g/mol e ponto de fusão variando de 283 a 285°C (HMDB, 2020). A constante de dissociação é $pK_a = 4,15$ e o coeficiente de participação de octanol/ água $\log K_{ow} = 4,51$ (NLM, 2020).

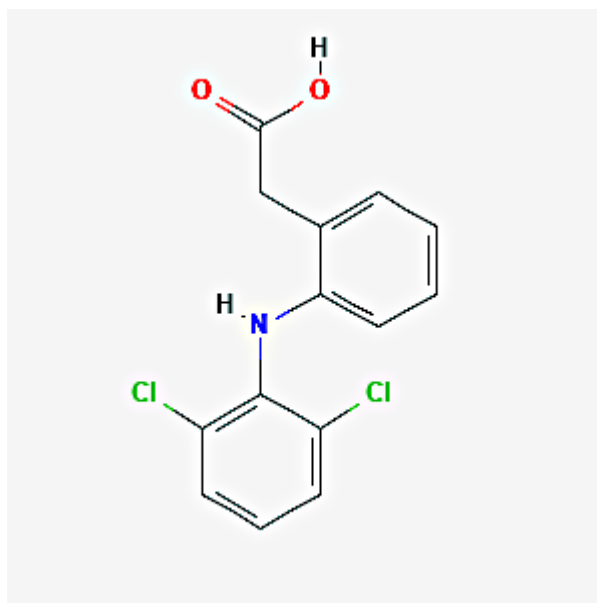


Figura 2 - Estrutura química do diclofenaco (Fonte: *National Center for Biotechnology Information*).

2.5 Sistema de CO₂

Com a finalidade de recriar diferentes cenários de acidificação oceânica, foi utilizado um sistema de injeção de CO₂ automático, alterando assim o pH dos sistemas onde se encontravam os organismos a serem estudados. O controle do gás liberado foi medido através dos valores de pH, já que quanto maior a emissão de CO₂ no sistema, menor será o pH do meio. Os sensores que realizaram as medições foram conectados a uma interface para que os valores de pH fossem monitorados utilizando-se o software Apex fusion.

Portando, durante a realização do experimento, os aquários com diferentes valores de pH simularam diferentes cenários de acidificação. O pH do primeiro tratamento é o encontrado em águas costeiras da região em questão, por volta de 8,0. Sabendo que o valor do pH prospectado para o fim do século será 0,4 unidades abaixo do atual, o pH do segundo tratamento foi de 7,6. Por fim, prospectando 0,7 unidades abaixo do atual pH e sabendo de usos de tecnologia de captura e armazenamento de carbono (CSS) e um possível vazamento desses sistemas, o terceiro tratamento trouxe um cenário mais crítico, com pH de 7,3.

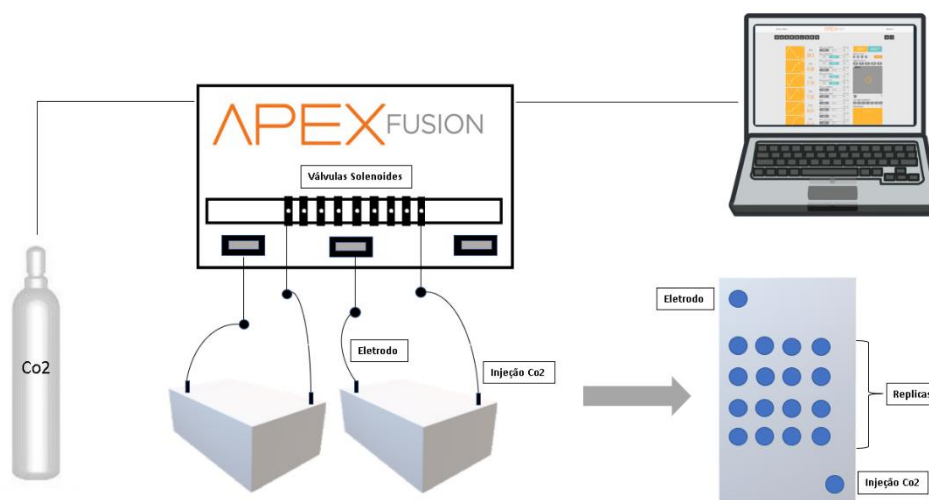


Figura 3 - Esquema do sistema de injeção de CO₂ automático para a realização do experimento.

2.6 Ensaio de toxicidade

O ensaio teve como função analisar os efeitos crônicos sofridos pelos organismos *Perna perna* durante a sua exposição ao DIC sob diferentes cenários de acidificação oceânica.

No Brasil, o mexilhão *Perna perna* vem sendo uma das espécies mais utilizadas como organismo modelo, uma vez que apresenta ampla distribuição na costa brasileira e atributos necessários aos bioindicadores, como acumular o poluente, possuir hábito sésil e ser abundante no ambiente estudado (Furley 1993)

Após a exposição, a hemolinfa dos organismos foi retirada para avaliação do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN), biomarcador que busca avaliar a integridade lisossômica dos organismos estudados. Os lisossomos são conhecidos por estarem relacionados a mudanças patológicas em plantas e animais e ultimamente vem sendo associados a uma variedade de doenças induzidas por poluentes no ambiente. (Lowe et al., 1995).

O corante vermelho neutro é um composto lipofílico cujo o transporte celular ocorre passivamente na célula (Lowe *et al.* 1994). O gradiente de difusão parte do citoplasma em direção a membrana lisossômica, fazendo com que o corante fique cada vez mais concentrado e, conseqüentemente, mais visível no interior da organela com o passar do tempo. A eficiência da retenção do corante depende do pH do

lisossomo e da bomba de prótons H⁺-ATPase encontrada na membrana lisossômica (Svendsen & Weeks, 1995). Em células saudáveis, a bomba de prótons pode manter o influxo, mantendo o gradiente de prótons. Uma vez que o corante recebe um próton ao atravessar a membrana, ele pode ser retido por esse mesmo influxo.

Contudo, a presença de um xenobiótico (como o DIC) pode reduzir a eficácia da bomba de prótons, resultando na diminuição do gradiente de prótons, que por sua vez causa a desprotonização do corante e, por fim, a não retenção deste. Quando isso ocorre, o vermelho neutro concentrado no lisossomo difunde-se para o citoplasma, espalhando-se rapidamente e resultando em células menos pigmentadas. Sendo assim, alterações deletérias ao sistema de bomba de prótons resultam na redução do tempo de retenção do corante (Francioni, 2005).

Após o período de exposição dos organismos ao fármaco, foram retirados 300 µL de hemolinfa de cada organismo utilizando uma seringa contendo 300 µL de solução fisiológica (utilizada para diluir a hemolinfa dos mexilhões e preparada um dia antes do término das exposições); após a retirada, o conteúdo de cada seringa foi transferido para um *eppendorf* devidamente identificado.

Em seguida, o conteúdo foi suavemente misturado e uma alíquota de 40 µL dessa solução (hemolinfa + solução fisiológica) foi transferida para uma lâmina. As lâminas foram mantidas em câmara escura por 15 minutos para a fixação celular e, após a incubação, o excesso em suspensão foi retirado e a área ao redor das células limpas para a remoção do excesso de fluido.

Após o excedente ter sido removido, 40µL do corante Vermelho Neutro foram adicionados sobre as lâminas e, depois de 15 minutos dentro da câmara à prova de luz (tempo em que o corante penetra nas células), as lâminas foram observadas com o auxílio de um microscópio óptico em 400 ampliações, e depois, sistematicamente a cada 15 minutos.

Durante o período de observação microscópica, as células foram analisadas quanto a anormalidade estrutural, ruptura lisossômica e o extravasamento do corante para o citoplasma (Lowe, 1995).

2.7 Análise de Resultados

A análise dos resultados determinou os valores de CEO (Concentração de Efeito Observado) e CENO (Concentração de Efeito Não Observado) para o DIC nos diferentes cenários de acidificação. Para isso, os dados foram submetidos a análise de normalidade e homogeneidade de variância pelos métodos de Chi-square e Bartlett, respectivamente. Posteriormente, foi feita a análise de variância (ANOVA – $p < 0,05$) por meio do método de Dunnett. Todas as análises foram realizadas utilizando o software PRISM 5.0. A determinação da concentração pontual de pH que causou alteração na estabilidade da membrana lisossômica de mexilhões *P. perna* em 50% (EpH50) foi calculada por meio do método de interpolação linear (Norberg-King, 1988).

3 RESULTADOS

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade com mexilhões *P. perna* expostos ao DIC sob os diferentes cenários de acidificação estão demonstrados na Figura 4. Após 96 horas de exposição, o tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos diminuiu significativamente em concentrações ambientalmente relevantes nos pH 8,0 e 7,6 (20 e 200 ng/L, respectivamente). Já no pH 7,3 não foi possível observar diferença significativa entre as concentrações. Para avaliação dos dados sobre os efeitos do exclusivamente do pH sobre a citotoxicidade, foi calculado o valor do EpH50 (pH: 7,43), o qual demonstra o pH que diminui o tempo de retenção do corante em 50% (Figura 5). O valor encontrado para a Concentração de Efeito Observável (CEO) foi de 20 ng/L.

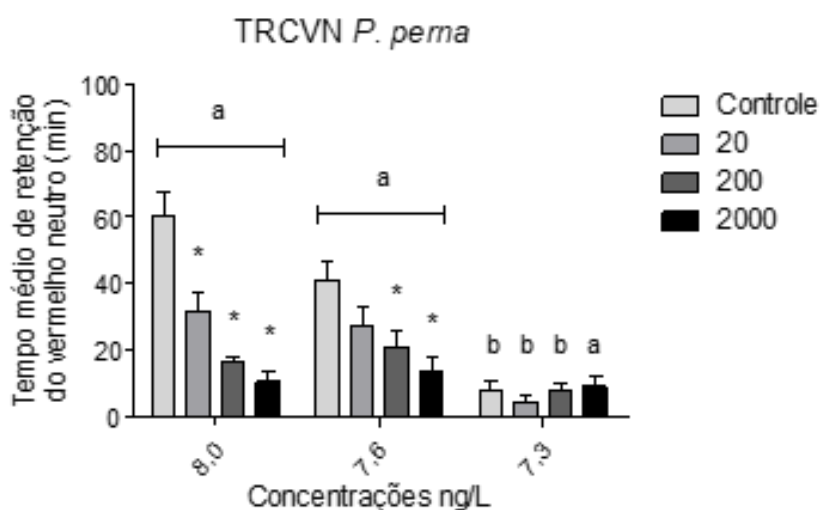


Figura 4 - Médias e erro-padrão dos resultados de citotoxicidade em hemócitos do molusco bivalve *P. perna* em água após 96 horas de exposição ao DIC nos diferentes pH. (*) Indica diferença significativa das concentrações de cada tratamento em relação ao seu respectivo controle, dentro de cada pH testado. As letras diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações (controle; 20; 200 e 2000 ng/L) entre diferentes tratamentos de pH.

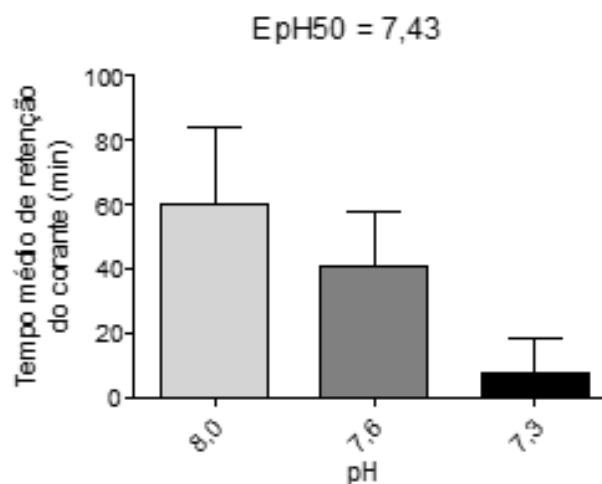


Figura 5 - Médias e desvio-padrão dos resultados da comparação entre os controles dos ensaios de citotoxicidade em hemócitos do molusco bivalve *P. perna* após 96 horas de exposição.

Tabela 2 - Resultados do sistema de carbonatos em ensaios na matriz água com *P. perna* expostos ao DIC sob pH 8,0.

Tratamento	TA ($\mu\text{mol/kg}$)	CIT ($\mu\text{mol/L}$)	HCO_3^- ($\mu\text{mol/kg}$)	CO_3^{2+} ($\mu\text{mol/kg}$)	CO_2 ($\mu\text{mol/kg}$)	ρCO_2 (μatm)	Ω Ca	Ω Ara
Controle	2230	2075,5	1934,3	120,9	20,4	626,7	2,99	1,93
20 ng/L	2300	2144,6	1999,9	123,4	21,4	659,2	3,06	1,97
200 ng/L	2280	2122,5	1977,4	124,2	20,8	645,7	3,08	1,98
2000 ng/L	2210	2049,7	1906,3	123,9	19,4	601,4	3,07	1,98

Tabela 3 - Resultados do sistema de carbonatos em ensaios na matriz água com *P. perna* expostos ao DIC sob pH 7,6.

Tratamento	TA ($\mu\text{mol/kg}$)	CIT ($\mu\text{mol/L}$)	HCO_3^- ($\mu\text{mol/kg}$)	CO_3^{2+} ($\mu\text{mol/kg}$)	CO_2 ($\mu\text{mol/kg}$)	ρCO_2 (μatm)	Ω Ca	Ω Ara
Controle	2480	2462,7	2342	57,5	63,2	1956,8	1,43	0,92
20 ng/L	2640	2613,7	2486	64,8	62,9	1938,6	1,61	1,03
200 ng/L	2580	2544,6	2420	66,8	57,8	1782	1,66	1,07
2000 ng/L	2420	2387,9	2271	61,6	55,3	1709,1	1,53	0,98

Tabela 4 - Resultados do sistema de carbonatos em ensaios na matriz água com *P. perna* expostos ao DIC sob pH 7,3.

Tratamento	TA ($\mu\text{mol/kg}$)	CIT ($\mu\text{mol/L}$)	HCO_3^- ($\mu\text{mol/kg}$)	CO_3^{2+} ($\mu\text{mol/kg}$)	CO_2 ($\mu\text{mol/kg}$)	ρCO_2 (μatm)	Ω Ca	Ω Ara
Controle	2350	2395,4	2263,9	35,6	95,9	2993,9	0,88	0,57
20 ng/L	2200	2253,8	2125,1	30,6	98,1	3057	0,76	0,49
200 ng/L	2500	2580,8	2424,8	31,4	124,6	3891	0,78	0,5
2000 ng/L	2900	3001,7	2817,1	35,4	149,2	4673,8	0,88	0,57

4 DISCUSSÃO

O aumento da população mundial junto a investimentos na área da saúde, avanços em pesquisas, grande disponibilidade no mercado global e envelhecimento da população em países industrializados levaram a um aumento significativo de consumo de fármacos nas últimas décadas.

Mais de 3.000 princípios ativos farmacêuticos vêm sendo administrados pelo mundo todo em prescrições médicas, medicações que não necessitam de receita médica para serem compradas e fármacos de uso veterinário. A produção desses princípios ativos é de aproximadamente 100.000 toneladas ao ano (Beek, et al., 2016).

Os fármacos podem adentrar o ambiente por efluentes domésticos, uma vez que estes são excretados pelo corpo humano com pouca ou nenhuma transformação (Bu, et al., 2016). Há também outras formas desses compostos chegarem no local, sendo elas por meio de efluentes hospitalares, industriais, agropecuários e inclusive por descarte indevido desses medicamentos (Sidrach-Cardona et al., 2014; Chang, et al., 2010).

O uso e subsequentemente a liberação desses compostos no ambiente causaram alto nível de resíduos nesses locais. Na tabela 5 abaixo, é apresentado o meio cuja presença de DIC foi encontrada junto a sua respectiva concentração e país.

Tabela 5 - Ocorrências recentes de DIC em ambientes aquáticos.

Ambiente	Concentração (ng L ⁻¹)	País	Referência
Rio	2–3	Finlândia	Lindqvist et al. (2005)
Rio	21–90	Canadá	Sosiak e Hebben (2005)
Rio	18–50	Canadá	Metcalf et al. (2003)
Estuário	195	Reino Unido	Thomas and Hilton (2004)
Rio	6.2	Alemanha	Weigel et al. (2002)
Rio	1030	Alemanha	Heberer, (2002a)
Água subterrânea/poços	2	Região mediterrânea	Rabiet et al. (2006)
Poços	380	Alemanha	Heberer et al. (2006)
Torneira de água potável	10	Alemanha	Heberer (2002a)
Rio	100–200	Alemanha	Letzel et al. (2009)
Rio	100–4900	Paquistão	Scheurell et al. (2009)
Lago	370	Suíça	Buser et al. (1998)
Rio	5–40	Reino Unido	Kasprzyk–Hodern et al. (2008)
Rio	26–72	Espanha, Bélgica, Alemanha	Hernandes et al. (2006)
Rio	20–91	Eslovênia	
Rios e lagos	1.1–6.8	Reino Unido	Hilton e Thomas (2003)
Rio	0.7	Coréia do Sul	Kim et al. (2007)
Poço	0.9	França	Rabiet et al. (2006)
Rio	9–282	França	Rabiet et al. (2006)
Rio	20–150	Eslovênia	Kosjek et al. (2005)
Poço	4.9–24	Suíça	Öllers et al. (2001)
		União Europeia (23 países)	Loos et al. (2010)
Aquífero	1.7	Espanha	Lopez– Serna et al. (2013)
Poço	3.1	Espanha	Lopez– Serna et al. (2013)
Delta	29.5–380	Espanha	Lopez– Serna et al. (2013)
Água potável	1.2	Estado Unidos	Benotti et al. (2008)
Rio	15.8–35.5	Áustria	Ahrer et al. (2001)
Rio	7.8–64.8	China	Dai et al. (2015)
Poço	290 (máx. observado)	Alemanha	Sacher et al. (2001)
Rio	260 (máx. observado)	Espanha	López– Serna et al. (2012)
Rio	15	Coréia do Sul	Yoon et al. (2010)
Rio	49	Espanha	Carmona et al. (2014)
Água de torneira	18	Espanha	Carmona et al. (2014)
Rio	34–145	Argentina	Valdés et al. (2014)
Água do mar (zona costeira subtropical)	19.4	Brasil	Pereira et al. (2016)
Rio	230 (máx. observado)	China	Ma et al. (2016)

Fonte: Linson Lonappan et al., 2016 (adaptada).

Para a avaliação dos efeitos fisiológicos do fármaco Diclofenaco, foi utilizado o biomarcador Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN) em mexilhões da espécie *Perna perna*.

A análise de biomarcadores em níveis tróficos inferiores é de grande utilidade, pois alerta para consequências nos níveis mais altos de organização biológica, por meio da magnificação trófica, antes que o impacto seja notado nos estudos convencionais ou pela população (Cheung et al. 1998).

Os dados do ensaio ecotoxicológico obtidos por meio do biomarcador supracitado mostram que em nosso atual pH oceânico (pH 8,0), o tempo de retenção do corante diminuiu significativamente a partir da concentração de 20 ng/L, enquanto que em um cenário de acidificação com pH 7,6, essa diminuição significativa ocorreu na concentração ambientalmente relevante de 200 ng/L.

Estudos apontam que um longo período de exposição a AINEs pode desencadear estresse oxidativo bem como mecanismos de defesa antioxidantes celulares (Gonzalez-Rey et al., 2014, Parolini et al., 2011). O aumento da produção de enzimas antioxidantes leva a um maior consumo energético ao organismo a fim deste manter a sua homeostase. Todavia, esse evento pode levar a efeitos negativos em outros processos essenciais a vida do organismo, como crescimento e reprodução (Munari et al., 2006).

Em um estudo sobre os efeitos da acidificação oceânica combinados com a presença de DIC e variações na temperatura na espécie de peixe *Dicentrarchus labrax*, Maulvault et al (2018) obtiveram resultados que os dois fatores citados concomitantes a exposição ao fármaco levaram a efeitos toxicológicos em níveis moleculares, como estresse oxidativo e degradação de proteínas, em níveis celulares, como anormalidades nucleares eritrocitárias e baixa viabilidade de eritrócitos e também em tecidos, como um menor índice de esteatose hepática.

Já em outro estudo, este sobre a viabilidade das larvas do molusco *Ruditapes philippinarum*, a combinação a acidificação junto ao DIC, podem ter levado a gastos energéticos além do sustentável pelos organismos, provocando quedas nas taxas de sobrevivência e crescimento (Munari et al, 2016).

Um estudo realizado por Hernroth et al. (2016) utilizando mexilhões da espécie *Mytilus edulis* demonstrou que os organismos apresentaram comportamento semelhante em ensaios de acidificação, fechando suas conchas por horas em pHs mais baixos como estratégia de sobrevivência.

Os efeitos da diminuição do pH em organismos calcificadores foi estudado por Szalaj (2016). É proposto que esses organismos se tornem mais vulneráveis, uma vez que gastam energia para o processo de calcificação, comprometendo assim a disponibilidade de energia para outras funções fisiológicas vitais, como o crescimento, ocasionando o retardo ou até mesmo a morte dos organismos.

Em relação aos parâmetros físico-químicos analisados neste estudo, foi possível observar alterações nos dados conforme os valores do pH foram reduzidos. Tanto o carbono inorgânico total (CIT) quanto a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) e o bicarbonato (HCO₃⁻) apresentaram aumento enquanto os níveis de calcita, aragonita e CO₃²⁻ reduziram. Tal comportamento já era esperado, uma vez que uma das consequências da absorção de CO₂ antropogênico é a redução da saturação de calcita e aragonita. O aumento de íons bicarbonato é justificado pelo processo de dissolução de CO₂ na água com o carbonato presente no ambiente, liberando tais íons.

Dessa forma, se torna necessário mais estudos sobre os efeitos das mudanças climáticas em conjunto a contaminantes emergentes no meio marinho, especialmente quando se trata de bivalves e seus diferentes estágios de vida, uma vez que se procura melhor entender se essas espécies se adaptam melhor aos estresses ambientais ao longo das gerações.

5 CONCLUSÃO

- ✓ O valor do EpH50 encontrado para a espécie de mexilhão *Perna perna* foi de 7,43;
- ✓ A CEO encontrada por meio da realização dos testes do tempo de retenção do corante vermelho neutro foi de 20 ng/L
- ✓ A avaliação dos efeitos citotóxicos confirmou a hipótese do estudo, uma vez que a redução dos níveis de pH potencializou os efeitos do DIC.

REFERÊNCIAS

- ARDELAN, M.V.; STEINNES, E.; LIERHAGEN, S.; LINDE, S.O. 2009. Effects of experimental CO₂ leakage on solubility and transport of seven trace metals in seawater and sediment. *Sci. Total Environ.*, 407: 6255-6266.
- ARNOLD, K. E., BROWN, A. R., ANKLEY, G. T. & SUMPTER, J. P., 2014. Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 19 Novembro.
- BASALLOTE, M.D.; RODRIGUEZ-ROMERO, A.; BLASCO, J.; DELVALLS, A.; RIBA, I. 2012. Lethal effects on different marine organisms, associated with sediment-seawater acidification deriving from CO₂ leakage. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 19:2550-2560.
- BEEK, T. A. D. ET AL., 2016. Pharmaceuticals in the environment--Global occurrences and perspectives. *Environ Toxicol Chem.*, Volume 35(4), pp. 823-835.
- BOTELHO, R. G.; MONTEIRO, S. H.; LUIZTORNISIELO, V. Veterinary Antibiotics in the Environment. *Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications*, 2 set. 2015.
- BRASIL, 2016. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos 2014, Brasília: SNSA/MCIDADES.
- BU, Q. ET AL., 2016. Pay attention to non-wastewater emission pathways of pharmaceuticals into environments. *Chemosphere*, Volume 165, p. 515-518.
- CALDEIRA, K. & WICKETT, M.E. 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res.*, 110:1–12.
- CETESB - Balneabilidade das praias paulistas e Relatório de qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo. 2017. ISBN 978-85-9467-011-3
- CETESB, 2001. Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, s.l.: s.n.
- CHANG, X. ET AL., 2010. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Environmental Pollution*, 158(5), pp. 1444-1450.
- CHEUNG VV, WEDDERBURN RJ, DEPLEDGE MH (1998) Molluscan lysosomal responses as diagnostic tool for the detection of a pollution gradient in Tolo Harbour, Hong Kong. *Marine Environmental Research* 46: 237-241.
- DE ORTE, M., SARMIENTO, A., BASALLOTE, M. & RODRÍGUEZ-ROMERO, A., 2014. Effects on the mobility of metals from acidification caused by possible CO₂ leakage from sub-seabed geological formations. *Sci. Total Environ*, pp. 356-363.
- DE ORTE, M.R.; SARMIENTO, A.M.; BASALLOTE, M.D.; RODRÍGUEZ-ROMERO, A.; RIBA, I.; DELVALLS, T.A. 2014b. Effects on the mobility of metals from acidification caused by possible CO₂ leakage from sub-seabed geological formations. *Sci. Total Environ.*, 470-471:356-363.

- DONEY, S. C., FABRY, V. J., FEELY, R. A. & KLEYPAS, J. A., 2009. Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. *Annual Review of Marine Science*, Volume 1, p. 169–92.
- FENT, K., WESTON, A.A., CAMINADA, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122e159.
- FRANCIONI E, WAGENER ALR, SCOFIELD AL, DEPLEDGE MH, CAVALIER B (2007). Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. *Marine Pollution Bulletin* 54: 329-338.
- FRIEDMANN, S.J. 2007. Geological Carbon Dioxide Sequestration. *Elements*, 3:179-184.
- FURLEY TH (1993) Utilização do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) como bioindicador dos metais pesados cádmio, chumbo, zinco, cobre e manganês do litoral do Rio Grande do Sul (Brasil). Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Fundação Universidade do Rio Grande.
- GATTUSO, J.-P. & HANSSON, L., 2017. *The Ocean revealed*. 1^a ed. Paris: CNRS Éditions.
- GROSSER T, FRIES S, FITZGERALD GA (2006) Biological basis for the cardiovascular consequences of Cox 2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest* 116: 4–15.
- HENRY D, LIM L, GARCIA RODRIGUEZ L, PEREZ GUTTHANN S, CARSON JL, ET AL. (1996) Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal antiinflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *BMJ* 312: 1563–1566.
- HERNANDEZ-DIAZ S, VARAS-LORENZO , GARCIA RODRIGUEZ L (2006) Non-steroidal antiinflammatory drugs and the risk of acute myocardial infarction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98: 266–274.
- HERNANDO, M., MEZCUA, M. & FERNÁNDEZ-ALBA, A. B. D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, pp. 334-342.
- HERNROTH, B.; BADEN, S.; TASSIDIS, H.; HÖRNAEUS, K.; GUILLEMANT, J.; BERGSTRÖM LIND, S.; BERGQUIST, J. 2016. Impact of ocean acidification on antimicrobial activity in gills of the blue mussel (*Mytilus edulis*), *Fish and Shellfish Immunology*, 55:452-459.
- HOUGHTON, R. A.; HACKLER, J. L., Trends: A Compendium of Data on Global Change (Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, TN, 2002), <http://cdiac.esd.ornl.gov/trends/landuse/houghton/houghton.html>.
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. In: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds Solomon, S.; Qin, D.; Manning, M.; Chen, Z.; Marquis, M.; Averyt, K.B.; Tignor, M.; Miller, H.L.), 996 pp. Cambridge University Press, Cambridge and New York.
- JOOS, F.; FROLICHER, T.; STEINACHER, M.; PLATTNER, G.K. 2011. Impact of climate change mitigation on ocean acidification projections. In: Gattuso, J.P.; Hansson, L. (eds) *Ocean acidification*. Oxford University Press, Oxford, pp. 272–290.

- KEATING, E.H.; HAKALA, J.A.; VISWANATHAN, H.; CAPO, R.; STEWART, B.; GARDINER, J.; GUTHRIE, G.; CAREY, J.W.; FESSENDEN, J. 2011. The challenge of predicting groundwater quality impacts in a CO₂ leakage scenario: results from field, laboratory, and modeling studies at a natural analog site in New Mexico, USA. *Energy Procedia*, 4:3239-3245.
- KEELING, C. D., T. P. WHORF, Atmospheric CO₂ records from sites in the SIO air sampling network, in *Trends: A Compendium of Data on Global Change, Carbon Dioxide Info. Anal. Cent., Oak Ridge Natl. Lab., U.S. Dep. of Energy, Oak Ridge, Tenn., 2000.*
- LOLIĆ, A., PAÍGA, P., SANTOS, L. H. M. L. M., RAMOS, S., CORREIA, M., & DELERUE-MATOS, C. (2015). Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. *Science of The Total Environment*, 508, 240–250. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.11.097
- LOWE DM, FOSSATO VU, DEPLEDGE MH (1995) Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussel *Mytilus galloprovinciales* from the Venice Lagoon: in vitro study. *Marine Ecology Progress Series* 129: 189-196.
- LOWE DM, PIPE RK (1994) Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cell: in vitro study. *Aquatic Toxicology* 30: 357-365.
- MARCO MUNARI, GIULIA CHEMELLO, LIVIO FINOS, GIANMARCO INGROSSO, MICHELE GIANI, MARIA G. MARIN, Coping with seawater acidification and the emerging contaminant diclofenac at the larval stage: A tale from the clam *Ruditapes philippinarum*, *Chemosphere*, Volume 160, 2016, Pages 293-302, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.095>.
- MARIA GONZALEZ-REY, MARIA JOÃO BEBIANNO, Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Aquatic Toxicology*, Volume 148, 2014, Pages 221-230, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.011>.
- MASSO GONZALEZ E, PATRIGNANI P, TACCONELLI S, GARCIA RODRIGUEZ L (2010) Variability among non-steroidal anti-inflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arth Rheum* 62: 1592–1601.
- MAULVAULT, A. L. ET AL., 2018. Integrated multi-biomarker responses of juvenile seabass to diclofenac, warming and acidification co-exposure. *Aquatic Toxicology*, Volume 202, pp. 65-79.
- MCGETTIGAN P, HENRY D (2006) Cardiovascular risk and inhibition of cyclo-oxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and non-selective inhibitors of cyclo-oxygenase. *JAMA* 296: 1633–1644.
- MCGETTIGAN P, HENRY D (2011) Cardiovascular risk with non-steroidal antiinflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. *PLoS Med* 8: e1001098.
- MCGETTIGAN P, HENRY D (2013) Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries. *PLoS Med* 10(2): e1001388. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001388>

- PAROLINI, M., BINELLI, A. & PROVINI, A., 2011. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 76(6), pp. 1586-1594.
- PASSARELLI, M. C. et al. 2017. Assessing the influence of ocean acidification to marine amphipods: A comparative study. *Science of the Total Environment*, 595:759-768.
- PASSARELLI, M.C.; RAY, S.; CESAR, A.; DELVALLS, T.A.; RIBA, I. 2018b. Effects of CO₂ enrichment on metal bioavailability and bioaccumulation using *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin*. 133:124-136.
- PASSARELLI, M.C.; RIBA, I.; CESAR, A.; DELVALLS, T.A. 2018a. What is the best endpoint for assessing environmental risk associated with acidification caused by CO₂ enrichment using mussels? *Mar. Pollut. Bull.*, 128:379-389.
- PASSARELLI, M.C.; RIBA, I.; CESAR, A.; NEWTON, A.; DELVALLS, T.A. 2018c. Using a mesocosm approach to evaluate marine benthic assemblage alteration associated with CO₂ enrichment in coastal environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 157:29-39.
- PAYÁN, M.C.; VERBINNEN, B.; GALAN, B.; COZ, A.; VANDECASTEELE, C.; VIGURI, J.R. 2012. Potential influence of CO₂ release from a carbon capture storage site on release of trace metals from marine sediment. *Environ. Pollut.*, 162:29-39.
- PEREIRA, C. ET AL., 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment*, pp. 148-154.
- PRENTICE, C. ET AL., in *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, J. T. Houghton et al., Eds. (Cambridge Univ. Press, New York, 2001), pp. 183– 237.
- PUBCHEM [INTERNET]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 3033, Diclofenac; [cited 2020 Dec. 27]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac>
- PUSCEDDU, F. ET AL., 2018. Environmental risk assessment of triclosan and 14 ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environmental Pollution*, pp. 274-283.
- SABINE, C. L. et al., in *The Global Carbon Cycle: Integrating Humans, Climate, And The Natural World*. SCOPE 62, C. B. Field, M. R. Raupach Eds. (Island Press, Washington, DC, 2004), pp. 17– 46
- SANTOS, L. et al., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, pp. 45-95.
- SEIBEL, B. A.; FABRY, V. J., *Climate Change and Biodiversity: Synergistic Impacts*, L. Hannah, T. Lovejoy, Eds. (Conservation International, Washington, DC, 2003), pp. 59 – 67.
- SIDRACH-CARDONA, R. et al., 2014. Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. *Science of The Total Environment*, Volume 488-489, pp. 220-227.

- SINGH S, WU O, LANGHORNE P, MADHOK R (2006) Risk of acute myocardial infarction with non-steroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 8: R153.
- SODRÉ, C. F. L., SILVA, Y. J. A. D. & MONTEIRO, I. P., 16. Acidificação dos Oceanos: fenômeno, consequências e necessidade de uma Governança Ambiental Global. *Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB*, 1(4), p. 14.
- SVENDSEN C, WEEKS JM (1995) The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). *Marine Pollution Bulletin* 31: 139-142.
- SZALAJ, D.; DE ORTE, M.R.; GOULDING, T.A.; MEDEIROS, I.D.; DELVALLS, T.A.; CESAR, A. 2016. The effects of ocean acidification and a carbon dioxide capture and storage leak on the early life stages of the marine mussel *Perna perna* (Linneaus, 1758) and metal bioavailability. *Environ Sci Pollut Res.*, 24(1):765-781.
- TRELLE S, REICHENBACH S, WANDEL S, HILDEBRAND P, TSCHANNEN B, ET AL. (2011) Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a network metaanalysis. *BMJ* 342: c7086.
- ZHANG, Y., GEISSEN, S.U., GAL, C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 407, 1151e1161.